

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



AN/33A

## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biologie  
Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire  
Option : biologie moléculaire de procaryotes

### Thème

**Isolement et caractérisation des rhizobia  
nodulant *Cicer arietinum*. L (Pois chiche)  
dans les régions de : Annaba, Constantine, Souk-Ahras et Taref.**

Présenté par :

ACHOUR Housseem  
BOUCHIHEB Meryem  
GUEDRI Mehdi  
ZADOURI Aicha

Devant le jury composé de :

Président : DAFRI AYAD Hayat. M.A. Univ Guelma  
Examineur : BENOURETH Djamel Eddine. Professeur. Univ Guelma  
Encadreur : RAHMANI BOUABIDE Rima. M.A. Univ Guelma



Juin 2011

## *Remerciement :*

*Louange à Dieu qui m'adonné l'esprit, le courage pour surmonter toutes les difficultés durant cette étude ainsi que l'endurance pour terminer ce projet.*

*Nous remercions particulièrement à nos directrice Mme. Maitre assistante RAHMANI BOUAABID Rima, pour son aide précieuse et ces conseils judicieux. Nous lui assurons le témoignage de mes profondes reconnaissances.*

*Nous tenons à exprimer tout d'abord nos remerciement aux membres de jury, qui ont accepté d'évaluer notre travail ; Mr. le professeur BENOUARTH Djamel Eddine qui a accepté d'examiner notre travail ; Mme. Maitre assistante DAFRI AYAD Hayat qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Un grand remerciement à tous le personnel technique du laboratoire de microbiologie et de biochimie, en particulier à Mme DJOURFI Houria.*

## Sommaire :

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

### Chapitre I : Etude bibliographiques

Symbiose légumineuse-*rhizobium* :

#### I -Macro-symbiote : les légumineuses

I-1 Généralités.....	3
I-2 pois-chiche.....	4
I-2-1 Définition.....	4
I-2-2 Historique et origine.....	4
I-2-3 Taxonomie et description.....	5
I-2-4 Ecologie de pois chiche.....	7
I-2-5 Intérêts nutritionnels.....	7
I-2-6 Place du pois chiche en Algérie.....	7
I-3 Légumineuses et fixation d'azote.....	8
I-3-1 Importance de l'azote dans la nutrition des plantes.....	8
I-3-2 Fixation biologique de l'azote.....	9
I-3-3 Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote.....	10

#### II- Micro-symbiote ; *les rhizobiums*

II-1 Généralités.....	10
II-2 Classification du rhizobium.....	11
II-3 Caractérisations phénotypiques.....	11
II-3-1 Caractères morphologiques du rhizobia.....	11
II-3-2 Critères symbiotiques.....	12
II-3-3 Critères culturaux.....	12
II-3-4 Critères biochimiques et physiologiques.....	14

### **III- Infection et la nodulation**

III-1 Infection.....	15
III-1-1 Phase de pré-infection.....	15
III-1-2 Phase de l'infection et de la formation des nodules.....	16
III-1-3 Phase de fonctionnement ou maturité des nodules.....	16
III-1-4 Phase de dégénérescence.....	17
III-2 Étapes du développement des nodosités.....	17
III-2-1 Echange de signaux.....	17
III-2-2 Formation des nodules.....	17
III-3 Structure et morphologie des nodules.....	19
III-4 Facteurs influençant la formation des nodules.....	19
III-5 Facteurs Nod.....	19
III-6 Gènes de la nodulation.....	20

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

### **I- Matériels**

I-1 Sites de collectes.....	21
I-2 Matériel végétal.....	22
I-3 Milieux de culture.....	23

### **II- Méthodes**

II-1 Collecte des nodules.....	24
II-2 Préparation de la suspension bactérienne.....	24
II-3 Isolement des souches.....	26
II-4 Conservation des souches.....	27
II-5 Etude des caractères phénotypiques des souches.....	27
II-6 Test de nodulation.....	30
II-7 Conservation des souches nodulantes sur glycérol.....	34

## **Chapitre III : Résultats et discussions**

1- Isolement des souches.....	35
-------------------------------	----

2- Etude des caractères cultureux microscopiques et biochimiques des souches .....	35
3- Etude des critères physiologiques .....	37
4- Etude de l'infectivité des souches.....	42

**Conclusion et perspectives**

**Résumé**

**Annexes**

**Références bibliographiques**

Produced with ScanTOPDF

*Liste des abréviations :*

<b>Co</b>	<b>Cobalt.</b>
<b>DO</b>	<b>Densité Optique.</b>
<b>E</b>	<b>Erythromycine.</b>
<b>G</b>	<b>Gentamicine.</b>
<b>GLY</b>	<b>Glycérol.</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Eau oxygénée.</b>
<b>ITGC</b>	<b>Institut Technique des Grandes Cultures.</b>
<b>N</b>	<b>Neomycine.</b>
<b>NET</b>	<b>Netilmicine.</b>
<b>N<sub>2</sub></b>	<b>Nitrogène.</b>
<b>NaCl</b>	<b>Chlorure de sodium.</b>
<b>NH<sub>3</sub></b>	<b>Ammoniac.</b>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>Ammonium.</b>
<b>NO<sub>3</sub></b>	<b>Nitrate.</b>
<b>Nod</b>	<b>Facteurs de nodulation.</b>
<b>nod</b>	<b>Gène de nodulation.</b>
<b>mM</b>	<b>milli Molaire.</b>
<b>OX</b>	<b>Oxacilline.</b>
<b>PIP</b>	<b>Piperaciline.</b>
<b>RA</b>	<b>Rifampicine.</b>
<b>TOB</b>	<b>Tobramicine.</b>
<b>VG</b>	<b>Virginiamycine.</b>
<b>YEMA</b>	<b>Yeast Extract Mannitol Agar.</b>
<b>YMB</b>	<b>Yeast Mannitol Broth.</b>

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Composition moyenne de graines légumineuses (valeurs extrêmes).....	4
<b>Tableau 2</b> : Spécificité de la symbiose rhizobium / légumineuse.....	13
<b>Tableau 3</b> : Altitude et pluviométrie des sites de la collecte.....	21
<b>Tableau 4</b> : Caractères cultureux, biochimiques, et microscopique des souches.....	36
<b>Tableau 5</b> : Résultats des différents antibiotiques testés.....	39
<b>Tableau 6</b> : Nombres aspects et diamètres des nodules induits par les souches.....	42

Produced with ScanTopdf

## Listes de figures :

Figure 1 : La plante de pois chiche.....	6
Figure 2 : Le pois chichi type kabuli.....	6
Figure 3 : Le pois chiche type Desi.....	6
Figure 4 : Le cycle de l'azote.....	9
Figure 5 : L'infection et la nodulation.....	16
Figure 6 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre <i>Rhizobium</i> et une plante.....	18
Figure 7 : Structure générale d'un facteur Nod produit par les rhizobia.....	20
Figure 8 : Représentation cartographique des sites d'échantillonnages.....	21
Figure 9 : Système racinaire de <i>Cicer arietinum</i> L.....	22
Figure 10 : Graines de <i>Cicer arietinum</i> L., cultivar FLIP 90-13.....	22
Figure 11 : Tri des nodules.....	24
Figure 12 : Stérilisation des nodules.....	25
Figure 13 : Technique d'isolement des rhizobia.....	26
Figure 14 : Colorations par la fuchsine.....	27
Figure 15 : L'apparition de radicelle.....	31
Figure 16 : Pots utilisés dans le test de nodulation.....	31
Figure 17 : Semis des graines.....	32
Figure 18 : Inoculation des graines.....	33
Figure 19 : Exposition de la culture à la lumière du jour.....	33
Figure 20 : Aspect cultural d'une souche isolée.....	35
Figure 21 : Aspects microscopiques des isolats.....	35



<b>Figure 22 :</b> Effet du pH sur la croissance des isolats de <i>Cicer areitinum</i> L.....	37
<b>Figure 23 :</b> Effet de température sur la croissance des souches.....	38
<b>Figure 24 :</b> Effet de salinité sur la croissance des souches .....	39
<b>Figure 25 :</b> Etude de la résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion.....	40
<b>Figure 26 :</b> Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats.....	40
<b>Figure 27 :</b> Système racinaire de plant témoin dépourvus de nodules.....	42
<b>Figure 28 :</b> Aspect des nodules induit par les isolats du pois chiche.....	43
<b>Figure 29 :</b> Comparaison du nombre des nodules induits par les isolats .....	44

Produced with Scantopdf

**Introduction :**

La symbiose *rhizobium*-légumineuses est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la légumineuse hôte et les bactéries du sol du groupe "rhizobia". Cette interaction, se traduit par la formation d'un organe spécialisé au niveau des racines de la plante nommé : "nodule ". À l'intérieur duquel, le *rhizobium* se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et le réduire en ammoniacque ( $NH_3$ ) assimilable par la plante hôte (Moreira et al., 1992 ; Jedar et al., 1996).

Parmi les légumineuses, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) exerce une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec des espèces du genre *Mesorhizobium* (*M. ciceri* et *M. mediterraneum*). Ces derniers sont spécifiques au pois chiche et forme des gros nodules (Liu et al., 2003). Ainsi, certaines espèces du genre du *Sinorhizobium* (*S. medicae* et *S. meliloti*) sont capables d'infecter le *Cicer arietinum* L. mais en formant des petits nodules inefficients (Aouani et al., 2001 ; Maâtallah et al., 2002).

Ainsi, sa contribution à la fertilisation du sol permet d'une part, d'augmenter le rendement grainier (production élevé). D'autre part, de fertiliser les sols de culture tout en minimisant l'apport des engrais chimiques. Ces derniers se révèlent être coûteux, très polluants et toxiques pour l'Homme (Bacha, 1998).

En Algérie, en dépit de la grande superficie de la culture du pois chiche, la production de cette légumineuse reste insuffisante devant une population sans cesse en augmentation (Maatougui M. H, 1998).

Vu son intérêt, Il nous a semblé qu'une meilleure connaissance des rhizobia nodulant le pois chiche dans le sol algérien, est un facteur important pour permettre l'amélioration du rendement de cette légumineuse.

Pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude des rhizobia nodulant *Cicer arietinum* L. cultivé dans quatre régions de l'Est algérien : Annaba (Barda), Constantine (Lakhroub), Taref (Besbes) et Souk Ahras (Tifech).

Dans ce cadre d'étude, l'objectif de notre recherche consiste à :

- ❖ Isoler, purifier et conserver des souches de rhizobia à partir des nodosités prélevées sur des plants de pois chiche collectés des quatre sites.
- ❖ Etudier l'infectivité des isolats de pois chiche.
- ❖ Caractériser les isolats d'un point de vue cultural, morphologique et physiologique.

# Chapitre I

## Etude Bibliographique

Produced with ScanTOPDF

### ***Symbiose légumineuse-rhizobium:***

L'association symbiotique plante légumineuse-bactérie est un processus indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie pour obtenir les nutriments nécessaires pour son développement (Gage, 2004).

## **I- Macro-symbiote : les légumineuses**

### **I-1 Généralités :**

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et 18000 espèces. Elles constituent la famille des *Fabaceae* sont définies par leur structure florale spécifique ainsi que leur gousses. Ces plantes viennent en deuxième rang après les graminées pour la satisfaction des besoins alimentaires de l'Homme (Djebali N, 2008).

Deux groupes de légumineuses peuvent être distingués :

- **Les légumineuses fourragères** : qui sont cultivées essentiellement pour leur système végétatif, producteur de matière verte (luzerne, trèfle....).
- **les légumineuses à graines** : qui sont cultivés principalement pour leurs graines riches en protéines utilisées soit pour l'alimentation humaine (arachide, fève, haricot, lentille, soja, pois chiche), soit pour l'alimentation animale (féverole, lupin,...) ; elles sont parfois utilisées en vert au début de la formation des graines (Aveline A et *al.*, 1999).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (Broughton et *al.*, 2003) (Tableau 1).

Tableau 1 : composition moyenne de graines légumineuses (valeurs extrêmes) (Hélène R., 2005).

Composant	Eau	Protéines	Lipides	glucides	Fibres totaux	Minéraux
<b>Légumineuse</b>						
<b>Pois cassés sec</b>	9-11	20-25	1.5	40-48	12-16	2.5-3.5
<b>Haricot blanc</b>	11	20-24.5	1.5-2	38-48	17	2.5-4
<b>lentille</b>	11-12	21.5-26	1-1.5	42-50	10.5-12	3
<b>Pois chiche</b>	10-11	13-25	3.5-5	43-48	9.5-15	2.7-4
<b>fève</b>	11	23	2	60 glucides totaux	8 fibres brutes	2.5
<b>Soja</b>	8.5-11	34-40	18-23	12	5-12	5
<b>Arachide</b>	9	23	45	-	-	4.9

## I-2 Pois-chiche :

### I-2-1 Définition :

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une plante de la famille des Fabacées voisine du petit pois mais d'un genre botanique différent. Il est cultivé dans les régions méditerranéennes et produit une graine comestible. Il détient un double record : haute teneur en glucides assimilables et pourcentage élevé en protéines végétales.

Son nom latin d'espèce *arietinum* fait référence à la forme de la graine en tête de bélier (*aries*) flanquée de ses cornes [1].

### I-2-2 Historique et origine :

Le pois chiche est parmi les premières légumineuses à graines domestiquées par l'Homme depuis l'antiquité. Les premières traces d'utilisation du pois chiche comme aliment

remontent à environ 7000 ans. Il aurait été cultivé pour la première fois dans la région méditerranéenne il y a 5000 ans (Van Der Maesen, 1987).

Cette légumineuse est originaire du Moyen-Orient, plus précisément du sud-est de la Turquie et de la Syrie (Saxena 1984 ; Smithson et al., 1985 ; Singh 1997). Il arriva sur les côtes du bassin méditerranéen après avoir traversé de nombreux pays et les Phéniciens pourraient être à l'origine de cette diffusion.

### I-2-3 Taxonomie et description :

Sur le plan taxonomique le pois chiche appartient à la famille de *Fabaceae*, sous-famille : *faboideae*, genre : *Cicer* et espèce : *Cicer arietinum* L. (Spichiger et al., 2002). Il s'agit d'une plante herbacée annuelle, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa germination est du type hypogé (les cotylédons restent souterrains). Ses racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, mais la plupart se trouve dans les premiers centimètres (Melakhessou Z, 2007).

- **Sa tige** anguleuse a une hauteur de 0,20 à 1 mètre de haut (Figure 1-A).
- **Ses feuilles** se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées (Figure 1-B).
- **Les fleurs** peuvent être blanche, bleues ou violette solitaires et pédonculées (Figure 1-C).
- **Les gousses** sont renflées à 1-2 graines presque rondes (Vander maesen L.J.C 1972) (Figure 1-D).

Selon la taille et la couleur des graines, on distingue deux types de pois chiche :

- **Le kabulé** : autre noms ; Garbanzo, Channa, Bengalgram ; variété a grosse graine (calibre des graines : 7-10 mm) de couleur crème et recouvert d'un tégument mince (Figure 2).
- **Le Desi** : autre noms, Kala channa, plus petit, plus foncé et recouvert d'un tégument épais (Figure 3) (Gorden, 2002).

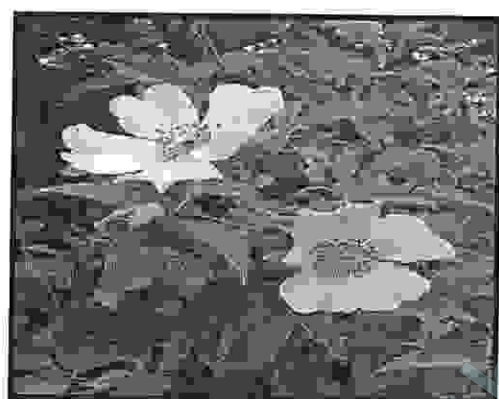
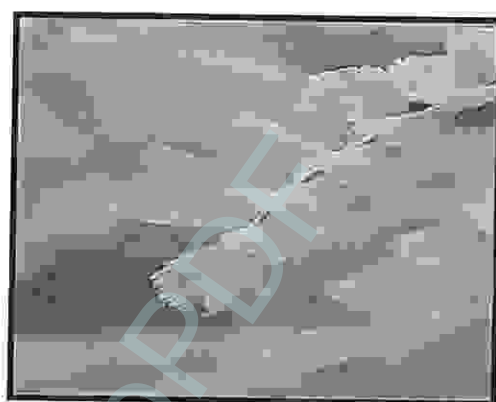


Figure 1 : La plante de pois chiche [2].



Figure 2 : Le pois chiche type kabuli [3].

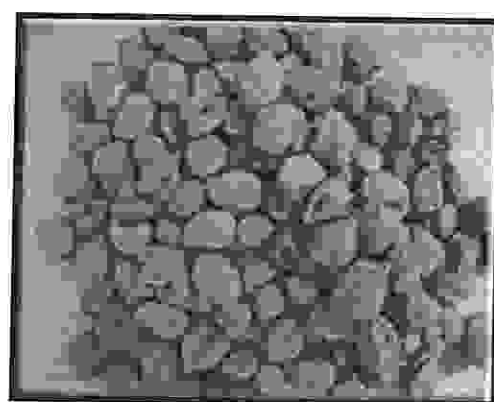


Figure 3: Le pois chiche type Desi [4].



#### 1-2-4 Ecologie de pois chiche :

La production du pois chiche est concentrée dans la saison froide et sèche, pousse à partir du niveau de la mer jusqu'au dessus de 2500 m d'altitude, mais il n'est pas bien adapté aux régions humides de basse altitude ou souvent il ne fleurit pas, il préfère les régions de pluviométrie annuelle de 500 à 1800 mm en tenant compte qu'il tolère la sécheresse.

Des températures de 10 à 25°C sont bonnes pendant la floraison. Les sols qui l'ont besoin sont d'un pH 5 à 7 et la salinité n'est pratiquement tolérée, voire pas du tout. Le pois s'accommode de tous les types de sols sous réserve qu'ils soient bien drainés et qu'ils offrent une bonne capacité de rétention en eau [5].

#### 1-2-5 Intérêts nutritionnels:

Le pois chiche constitue une excellente source de protéine (20,5%), de glucides (61%), de fibres, de vitamines (groupe B) et de minéraux (phosphore, potassium) avec une valeur énergétique de 362 calories pour 100g (Gorden, 2006).

#### 1-2-6 Place du pois chiche en Algérie :

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est en Algérie, la seconde légumineuse alimentaire produite après les fèves. Sa culture a connu, durant la décennie 1980- 1990 une certaine évolution progressive sur le plan des superficies et de la consommation et une évolution régressive en terme de productivité.

Les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie sont souvent d'ordre agro techniques liées aux conditions de semis (période, modes de semis, qualité de la semence) et à l'infestation par les adventices (Hamadache et Aït Abdallah, 1998).

### I-3 Légumineuses et fixation d'azote :

La spécificité de la famille des légumineuses est leur aptitude à fixer l'azote en symbiose avec des microorganismes du sol.

#### I-3-1 Importance de l'azote dans la nutrition des plantes :

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. Il s'agit du constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux ( $N_2$ ) mais les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement.

Elles absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates ( $NO_3$ ) et d'ammonium ( $NH_4^+$ ). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Figure 4).

Mais les légumineuses peuvent aussi acquérir l'azote grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec des bactéries du sol collectivement appelées *Rhizobium*. Dans ce cas, elles ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol.

La production des engrais azotés demande beaucoup d'énergie: l'énergie nécessaire à la production chimique d'une tonne d'engrais azoté par l'industrie est de 2.5 tonnes de pétrole. Leur coût ne cesse donc d'augmenter proportionnellement au prix du pétrole [6]. La fertilisation azotée des plantes joue donc un rôle important dans l'accroissement de l'effet de serre et est ruineux économiquement tout en créant une pollution importante car souvent les nitrates sont lessivés lors des pluies et atteignent la nappe phréatique.

La culture des légumineuses représente donc le meilleur moyen de produire des protéines tout en respectant l'environnement: c'est un exemple de culture dans le cadre d'une agriculture durable (Link et al., 2006).

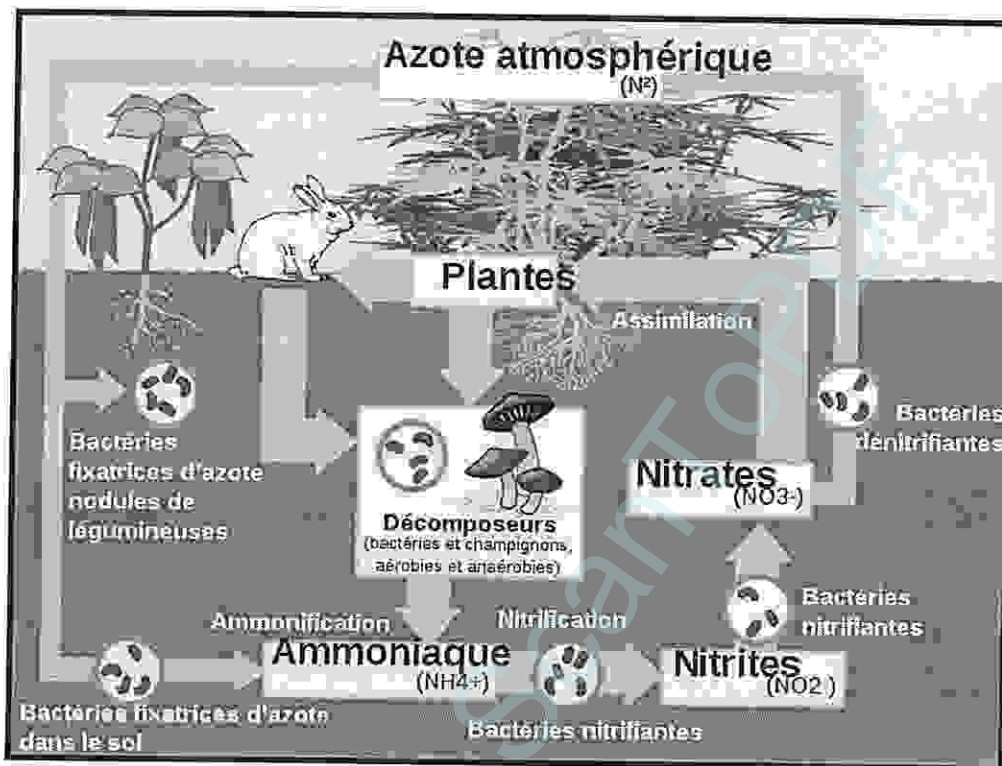


Figure 4 : Le cycle de l'azote [7].

### I-3-2 Fixation biologique de l'azote :

La fixation biologique de l'azote est effectuée soit par des microorganismes autonomes, soit en symbiose avec des plantes supérieures. En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces (quelques centaines au plus) possèdent des nodules fixateurs d'azote. Il s'agit exceptionnellement d'une association avec les arbres comme *Parasponia* ou avec des actinomycètes (bactéries filamenteuses) du genre *Frankia*. Dans ce cas, les plantes hôtes, dites plantes actinorhiziennes, sont des arbres ou des arbustes appartenant à des familles primitives: *Alnus*, *Casuarina*...

La symbiose fixatrice d'azote est un processus complexe déterminé par les deux partenaires.

L'un des systèmes les plus étudiés est celui associant les bactéries rhizobiales avec les légumineuses (Benson et Silvester, 1993).

### I-3-3 Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote :

Les bactéries de la famille des *rhizobiacées* peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelés nodosités ou nodules. Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse.

Le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique  $N_2$  sous forme ammoniacale. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé Nitrogénase d'origine bactérienne.

Cette association à bénéfice réciproque entre la légumineuse et les bactéries est appelée symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique (Downie, 2005).

## II- micro-symbiote : les *rhizobiums*

### II-1 Généralités :

La biodiversité microbienne forme une ressource naturelle énorme pour l'humanité. Les bactéries de racine (*rhizobia*) sont des bactéries du sol, de forme bâtonnets, à Gram négatif.

Phénotypiquement, se sont les fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique dans les nodules des racines ou des tiges des plantes légumineuses où elles se différencient en bactéroïdes (Gage, 2004 ; Graham, 1991 ; Haukka et coll., 1998). Au début, toutes les bactéries symbiotiques des légumineuses ont été classées en un seul genre, nommés rhizobium (Fred et al., 1932).

➤ Jordan en 1984 a classé ces bactéries en deux genres :

- Le genre *Rhizobium* : qui regroupe les souches à croissance rapide.
- Le genre *Bradyrhizobium* : qui inclut les souches à croissance lente.

La taxonomie des *Rhizobium* est en changement permanent. Ceci est dû aux progrès technologiques dans chacun des trois critères utilisés en taxonomie: la morphologie, la physiologie et l'analyse des séquences. Jusqu'en 2003, 36 espèces rhizobiales étaient distribuées en 7 genres.

Au cours de ces dernières années, huit nouvelles espèces rhizobiales ont été décrites. Les 44 espèces identifiées (Sahgal et Johri 2006) sont désormais classées en 11 genres, dont 9 appartiennent à l'*α*-*proteobacteria*: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*. Le genre *Sinorhizobium* est composé de 5 espèces: *S. meliloti*, *S. medicae*, *S. teranga*, *S. saheli*, et *S. fredii* (Biondi et al., 2003).

## II-2 Classification du rhizobium :

Actuellement, les rhizobia sont représentées par 12 genres et 44 espèces. Le tableau suivant récapitule les principaux genres et espèces connus ainsi que leur plante hôte.

## II-3 Caractérisations phénotypiques :

La caractérisation phénotypique classique des rhizobia se base sur des critères morphologiques, symbiotiques, culturels, biochimiques et physiologiques (Graham et al., 1991).

### II-3-1 Caractères morphologiques du rhizobia :

Les rhizobia sont des bâtonnets, Gram négatif, aérobies, non sporulant d'une largeur variant entre 0.5 et 0.9 $\mu$ m et une longueur entre 1.2 et 3 $\mu$ m. Ces bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou deux à six flagelles péritriches (Jordan, 1984 ; Somasegaran et Hoben, 1994).

Sur la base de la matière sèche, les cellules des rhizobia contiennent 52 à 55% de carbone et 4 à 5% d'azote (Allen et Allen, 1950).

Les bactéries du genre *Rhizobium* se trouvent sous deux formes :

- **Une forme végétative (non bactéroïde) :** ce sont des microorganismes réguliers que l'on trouve dans la rhizosphère et/ou dans le cordon d'infection, très mobiles quand ils sont jeunes.
- **une forme bactéroïde :** chez les groupes *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium meliloti* et *Rhisobium leguminosarum*, les individus sont irréguliers et ont une taille à peu près dix fois plus grande que ceux de la forme végétative (Somasegaran et Hoben, 1994).

### II-3-2 Critères symbiotiques :

Indiquent la capacité ineffective, effective et compétitive d'une souche donnée. Il existe divers degrés dans l'effectivité, une souche de rhizobium sera classée ineffective, effective ou très effective selon le niveau de son activité nitrogénasique (Giraud.E, 2007).

- **L'ineffectivité** des rhizobia exprime le pouvoir de la bactérie à noduler une ou plusieurs légumineuses hôtes. Elle peut être facilement évaluée par le dénombrement des nodosités formées.
- **L'effectivité** ou **efficacité** c'est l'aptitude d'un microorganisme à fixer l'azote dans le nodule.
- **La compétitivité** représente la résistance de la souche bactérienne considérée aux microorganismes antagonistes et la concurrence avec les souches indigènes pour la nodulation (Ayisi et al., 1992 ; Kurlovick et al., 1997 ; Howieson et al., 1998).

### II-3-3 Critères culturaux :

Deux groupes sont généralement assignés aux cultures des rhizobia. Le premier groupe comporte les rhizobia à croissance rapide, qui produisent une turbidité en bouillon et présentent une bonne croissance sur la surface des milieux solides dans 5 à 7 jours. Le deuxième groupe implique les rhizobia à croissance lente, qui exigent de 9 à 12 jours ou plus pour obtenir approximativement le même développement (Allen et Allen, 1950).

Tableau 2: spécificité de la symbiose *rhizobium* / légumineuse (Sahgal et Johri, 2003)

Genus	Species	Host	
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Nepentia natans</i>	
<i>Azorhizobium</i>	<i>Az. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	
	<i>B. japonicum</i>	<i>G. max</i>	
	<i>B. liaoningense</i>	<i>G. max</i>	
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arretinum</i>	
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>	
	<i>M. loti</i>	<i>Loti</i>	
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arretinum</i>	
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Leucaena</i>	
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza, Sophora and Glycine</i>	
<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria pedocarpa</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>R. loti</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>	
	<i>R. gallicum</i>	<i>P. vulgaris</i>	
	<i>R. giardinii</i>	<i>P. vulgaris</i>	
	<i>R. hainanense</i>	<i>Centrosema, Desmodium, Stylosanthes, Tephrosia</i>	
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	
	<i>R. leguminosarium</i>	<i>Trifolium, Vicia</i>	
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	
	<i>R. phaseoli</i>	<i>P. vulgaris</i>	
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum hedysari</i>	
	<i>R. tropici</i>	<i>Leucaena, P. vulgaris</i>	
	<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea, Trisperma</i>	
		<i>Corollina varia and Gueldenstaedtia multiflora</i>	
	<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i>
		<i>S. fredii</i>	<i>Prosopis chilensis</i>
		<i>S. kostense</i>	<i>G. max</i>
		<i>A. senegal, P. chilensis</i>	
<i>S. medicae</i>		<i>Medicago spp.</i>	
<i>S. meliloti</i>		<i>Medicago sativa</i>	
<i>S. saheli</i>		<i>Sesbania</i>	
<i>S. terangaie</i>		<i>Acacia, Sesbania</i>	
<i>S. xinjiangense</i>	<i>G. max</i>		

### II-3-4 Critères biochimiques et physiologiques :

Le *Rhizobium* possède un système respiratoire, où l'oxygène est l'accepteur terminal des électrons dans les conditions d'aérobic; alors que dans les conditions d'anaérobic, les espèces de *Rhizobium* peuvent utiliser les nitrates et les nitrites comme accepteurs d'électrons (Werner, 1992 et Benguedouar, 2000).

- **Température et pH :** Une croissance optimale de la plupart des souches de *Rhizobium* a lieu à des températures variant de 25 à 30°C et un pH 6,0 à pH 7,0 (Somasegaran et Hoben, 1994). Les températures extrêmes sont de 4°C et 42,5°C. Les souches de *Rhizobium* peuvent se développer à pH compris entre 4,5 et 9,5 (Jordan, 1984).
- **Tolérance à la salinité :** La plus part des souches sont inhibées par des concentrations de 100 mM NaCl. Cependant il existe des souches très tolérantes ex : méso-rhizobium nodulant le pois chiche peut tolérer 340 mM NaCl (Singleton et al., 1982).
- **Résistance aux antibiotiques :** Généralement les rhizobia à croissance rapide sont plus sensibles que les *bradyrhizobia* aux antibiotiques suivants : tétracyclines, pénicilline G, viomycine, et streptomycine (Jordan, 1984).
- **Résistance aux métaux lourds :** Les métaux lourds sont présents naturellement dans le sol. Certains métaux tels que le fer, le phosphore, le molybdène, le calcium et le nickel sont indispensables pour la croissance aussi bien des rhizobiums que de leurs plantes hôtes.

D'autres métaux tels que le cadmium, l'aluminium, le mercure, etc. ne semblent présenter aucune utilité. La disponibilité de ces éléments se situe soit à des niveaux très bas ou très en excès, au point de la toxicité (Ernst, 1990).



### III- Infection et la nodulation :

La fixation azotée prend place dans des nodules localisés dans les racines de la plante hôte. Mais le processus de fixation biologique de l'azote est précédé par la formation de nodules ou nodosités. En terme général, les nodules sont le résultat d'infection des racines par les bactéries. Le processus est appelé nodulation. Le processus d'infection des racines par les *Rhizobium* est connu sous le nom de l'infection (Figure 5).

#### III-1 Infection :

Le processus d'infection et de formation des nodules est divisé en quatre étapes majeures : la pré-infection, l'infection et la formation des nodules, le fonctionnement des nodules et une phase de dégénérescence (Sanchez et *al.*, 1991).

##### III-1-1 Phase de pré-infection :

Le processus d'infection débute par une augmentation du nombre de bactéries au niveau de la racine (Richter, 1993). Les légumineuses stimulent les *Rhizobium* dans leur rhizosphère par sécrétion de flavonoïdes qui activent les facteurs Nod déclenchant ainsi la transcription des gènes de nodulation. Il s'ensuit que le poil se recourbe de façon caractéristique et comprime la bactérie engagée dans la couche mucilagineuse de la surface de la paroi. La déformation des poils absorbants de la plante est due à l'action d'auxines végétales.

- Les Rhizobia colonisent le sol dans le voisinage des poils absorbants en réponses aux signaux envoyés par les racines ; en retour les *Rhizobium* stimulent les poils absorbants afin qu'ils se recourbent.
- Les Rhizobia envahissent les racines et forment le cordon d'infection.
- Le cordon d'infection pénètre de nombreuses cellules corticales pour former le nodule
- La dernière étape (non représenté) est la libération des Rhizobia.

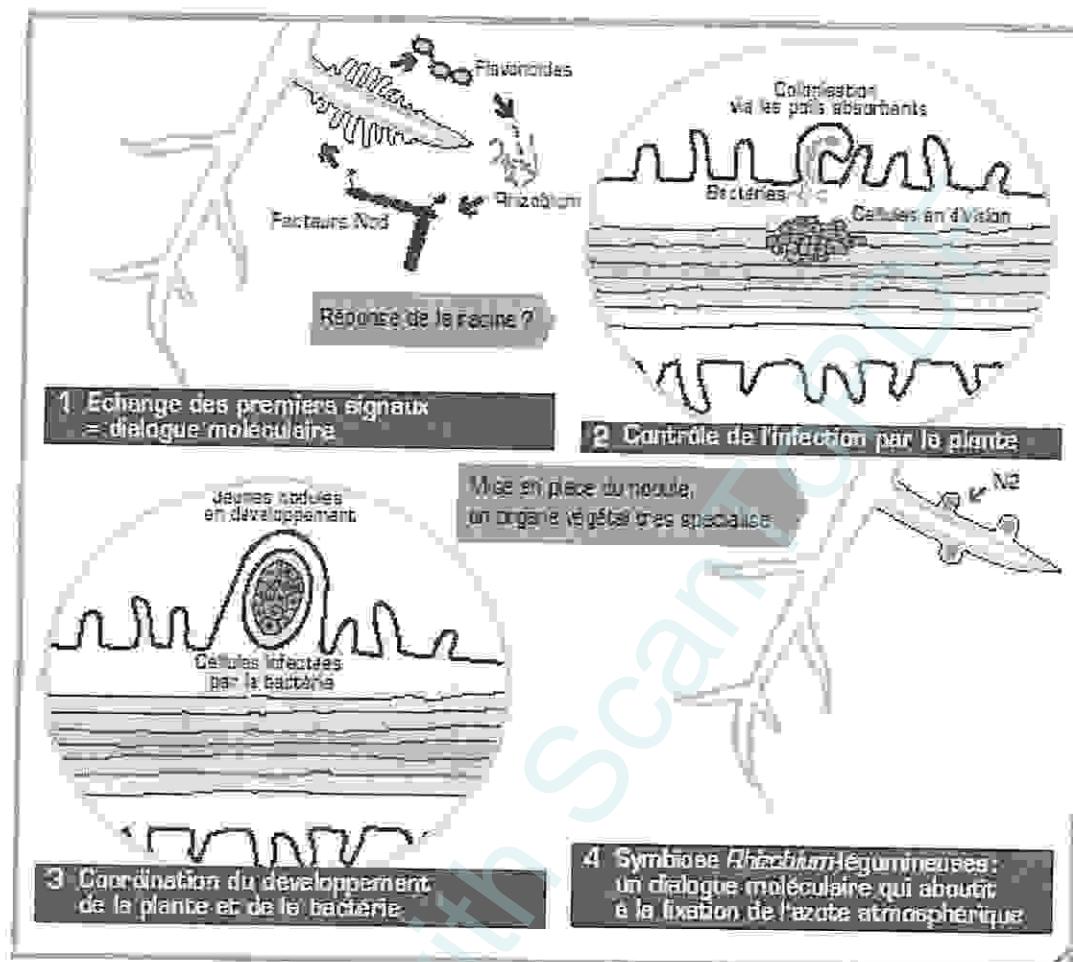


Figure 5 : L'infection et la nodulation (Journet, 2004).

### III-1-2 Phase de l'infection et de la formation des nodules :

L'infection consiste en la pénétration des *Rhizobium* en différents points du système racinaire. Il se forme dehors, dans le poil absorbant, une poche d'infection qui s'agrandit en un filament infectieux. Après avoir pénétré dans les poils absorbants, les bactéries sont entourées par un cordon d'infection.

### III-1-3 Phase de fonctionnement ou maturité des nodules :

Les nodosités se forment par multiplication des cellules infectées. Les *Rhizobium* prennent la forme bactéroïde, entourés par une membrane pér bactéroïdienne, après leur libération du cordon d'infection (Hopkins., 1999). La membrane pér bactéroïdienne a pour

rôle la stabilité du système hôte/symbiose ; si elle est endommagée, les bactéries vont se libérer dans le cytoplasme et considérées comme des corps étrangers et donc détruits par la cellule hôte.

#### III-1-4 Phase de dégénérescence :

L'étape finale dans le processus d'infection se déroule lors de la lyse des bactéroïdes et de la libération des bactéries dans le sol (Richter, 1993).

#### III-2 Etapes du développement des nodosités :

La nodulation est un processus d'interactions complexes entre les deux partenaires. Les mécanismes moléculaires de reconnaissance entre la plante hôte et les bactéries sont considérés comme une forme de communication entre les cellules. Un échange précis de signaux moléculaires entre la plante hôte et les *rhizobia* est essentiel pour le développement de nodules (Begum et Gafur, 2001) (Figure 6).

##### III-2-1 Echange de signaux :

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* commence par l'échange de signaux moléculaires entre la plante et la bactérie, des flavonoïdes produits par la plante attirent les *Rhizobium* et déclenchent la production et l'apparition de facteurs de nodulation (Nod) chez les bactéries (Trevaskis et al., 2002).

##### III-2-2 Formation des nodules :

La plante produit une nouvelle région méristématique (ou nodule) dont l'augmentation rapide loge les *Rhizobium* et leur procure l'eau et les nutriments. Les *Rhizobium* en retour utilisent la partie des éléments à fournir pour produire de l'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) à partir du  $\text{N}_2$ . Le  $\text{NH}_3$  est transformé en un composé organique pour faciliter le transport et utilisé par la plante.

Le développement des nodosités racinaires chez les plantes légumineuses est déclenché par des signaux diffusables : des lipochitoooligosaccharides. Ces facteurs Nod sont produits par les *rhizobia* à l'approche de la rhizosphère des plantes hôtes.

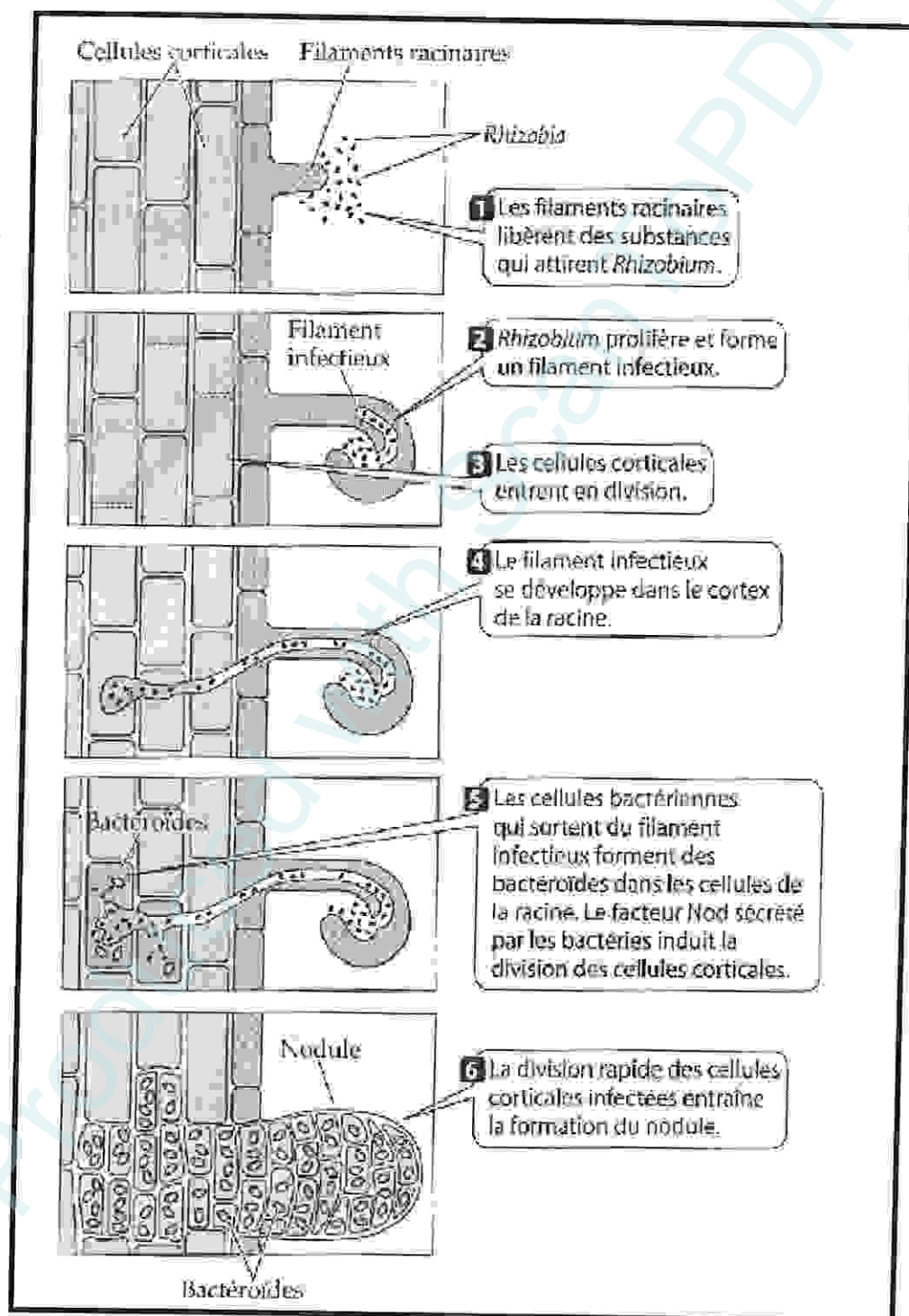


Figure 6 : Développement des nodules sur les racines dans un cas de symbiose entre *Rhizobium* et une plante (Perry et al., 2004).

### III-3 Structure et morphologie des nodules :

Le nodule achevé peut prendre deux formes : soit cylindrique, soit sphérique. Ils subissent une étonnante différenciation morphologique : centrale, les cellules dépourvues de symbiotes forment vers l'extérieur une sorte de tissu cortical ; des faisceaux d'éléments conducteurs sont reliés à un faisceau conducteur central de la racine. A l'exception de ces zones de différenciations particulières, lors de symbiose efficace, la plupart des cellules du nodule sont remplies de bactéroïdes (Richter, 1993, Trevaskis et *al.*, 2002).

### III-4 Facteurs influençant la formation des nodules :

L'organogénèse des nodosités dépend de la condition physiologique de la plante, par exemple la croissance sous limitation de l'azote combiné. En plus, les hormones végétales, agissent comme des facteurs généraux du contrôle de la division cellulaire et de la différenciation tissulaire (Richter, 1993).

### III- 5 Facteurs Nod :

Les facteurs Nod produits par le partenaire bactérien, ont une très grande activité biologique et induisent à de très faibles concentrations la mise en route d'une partie du programme symbiotique de l'hôte.

Ce sont des lipochitoooligosaccharides spécifiques qui affectent les plantes de diverses façons et le premier effet visible est le recourbement des poiles absorbants (Trevaskis et *al.*, 2002).

Seuls les facteurs Nod spécifiques induisent la courbure et la formation de l'infection (première étape lors de la formation des nodules) (Simms, 2002). Dans l'interaction *Rhizobium*-plante, on observe un haut niveau de spécificité. Cette spécificité est basée sur une communication moléculaire, c'est à dire un échange de signaux flavonoïdes excrétés par la racine de la plante hôte.

Chez les bactéries, les gènes de la nodulation (gène *nod*) sont induits par le signal flavonoïde, et cette induction mène à la production et à l'excrétion des signaux de nodulation, les facteurs Nod. La structure de base des lipochitooligosaccharides est modifiée chez les différentes espèces de *Rhizobium*. Donc, la structure spécifique des facteurs Nod produits par chaque espèce de *Rhizobium* sert comme signal permettant la reconnaissance de la présence de la bactérie par sa plante hôte (Richter, 1993) (Figure 7).

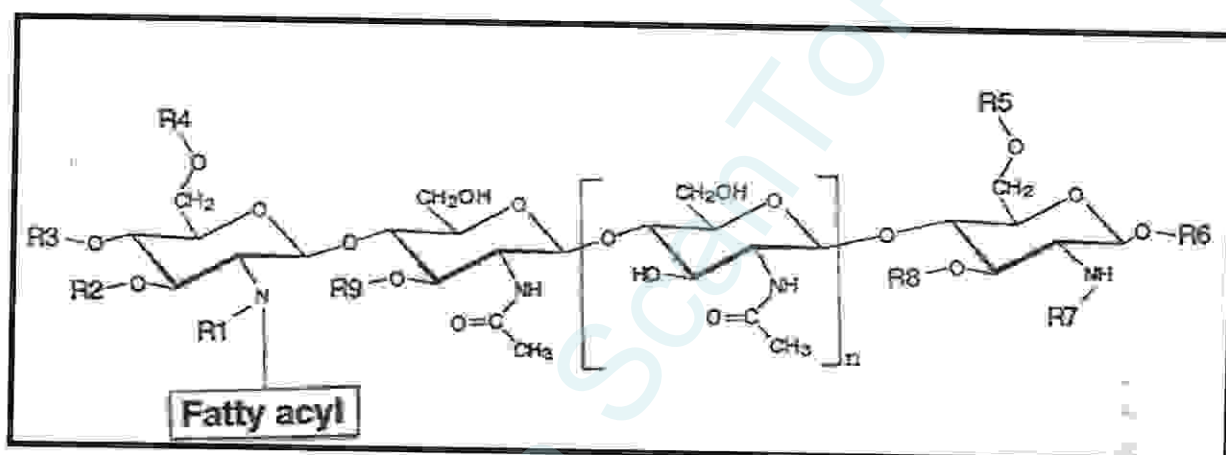


Figure 7 : Structure générale d'un facteur Nod produit par les rhizobia (Spaink, 2000).

### III-6 Gènes de la nodulation :

Les différents *Rhizobium* utilisent des mécanismes génétiques et moléculaires similaires pour reconnaître et infecter les légumineuses-hôtes ; Des gènes Nod qui sont impliqués dans un dialogue moléculaire entre les deux partenaires, la reconnaissance de signaux symbiotiques de la plante et la production par la bactérie de signaux ; et les facteurs Nod, provoquant de nombreuses réponses symbiotiques (Richter, 1993).

# Chapitre II

## Matériels et Méthodes

**I-Matériel :**

**I-1 Sites de collectes:**

Les plants de pois chiche utilisés dans cette étude ont été collectés à partir de quatre régions de l'Est Algérien : Constantine (El khroub), Annaba (Berda), Taref (Besbess) et Souk Ahras (Tifèche) (Figure 8). Ces endroits diffèrent sur le plan climatique récapitulé dans le tableau ci-dessous.

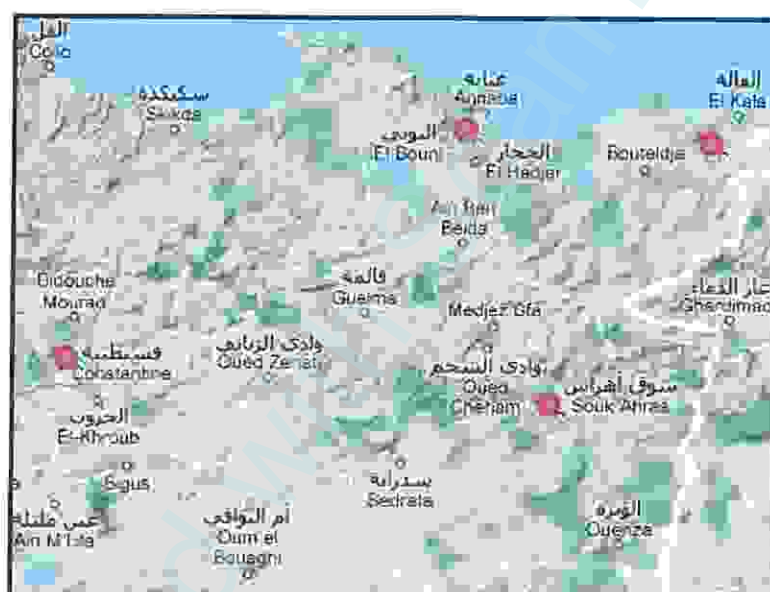


Figure 8: Représentation cartographique des sites d'échantillonnages [8].

Tableau 3 : Altitude et pluviométrie des sites de la collecte [9].

/	Annaba	Constantine	Souk ahrass	Taref
Altitude (mètre)	10-25	649	686	25
Pluviométrie/ Ans	1100 mm	556.14	300	1300



**I-2 Matériel végétal :****❖ Nodules de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) :**

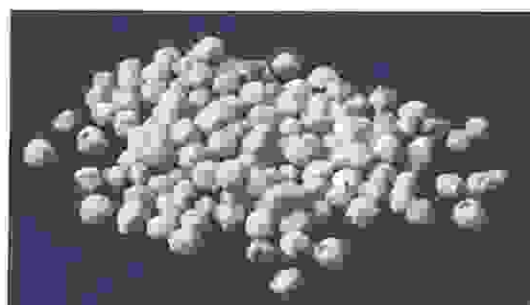
Les nodules utilisés dans l'isolement des rhizobia sont de la variété FLIP: 90-13. Pour les nodules issues des sites : Annaba, Souk Ahrass et Taref. Cependant, ceux du site constantine sont de la variété FLIP : ILC 32-79 . La figure suivante représente un système racinaire d'un plant de pois chiche collecté.



**Figure 9: Système racinaire de *Cicer arietinum* L.**

**❖ Graines de pois chiche :**

Les graines de *Cicer arietinum* L. cultivar FLIP 90-13 (récolte 2009), fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de la ville de Guelma, ont été utilisées a fin de tester l'infectivité des souches (Figure 10).



**Figure 10: Graines de *Cicer arietinum* L. ; cultivar FLIP 90-13.**

### I-3 Milieux de culture :

#### ❖ Milieu YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) additionné de rouge Congo :

Les milieux de culture YEMA à base d'extrait de levure (Yeast Extract) et mannitol (comme source de carbone) sont les plus utilisés pour l'isolement des rhizobia. La composition du milieu YEMA utilisée dans notre travail est représentée en annexe.

L'additionnement du colorant rouge de Congo au milieu YEMA permet de différencier les rhizobia des autres groupes de bactéries et faciliter ainsi l'isolement.

#### ❖ Milieu YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth) :

Le bouillon YEM a été utilisé pour réaliser les tests phénotypiques ainsi que la conservation des souches nodulantes sur glycérol (voir annexe).

#### ❖ Solution d'arrosage :

La solution nutritive utilisée pour l'arrosage des plantes de pois chiche est à base d'extrait du sol. Ce dernier a été pris du terrain d'expérimentation ITGC. La méthode de préparation de cette solution nutritive est représentée en annexe.

## II- Méthodes :

## II-1 Collecte des nodules :

La collecte est réalisée selon les techniques préconisées par Vincent, J.M. (1970). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20cm dans le sol pour extraire la plante et son appareil racinaire. Manuellement, on élimine de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet ; les nodules sont ensuite détachés à 1-2 cm de leur point d'attache.

## II-2 Préparation de la suspension bactérienne :

## ❖ Choix des nodules :

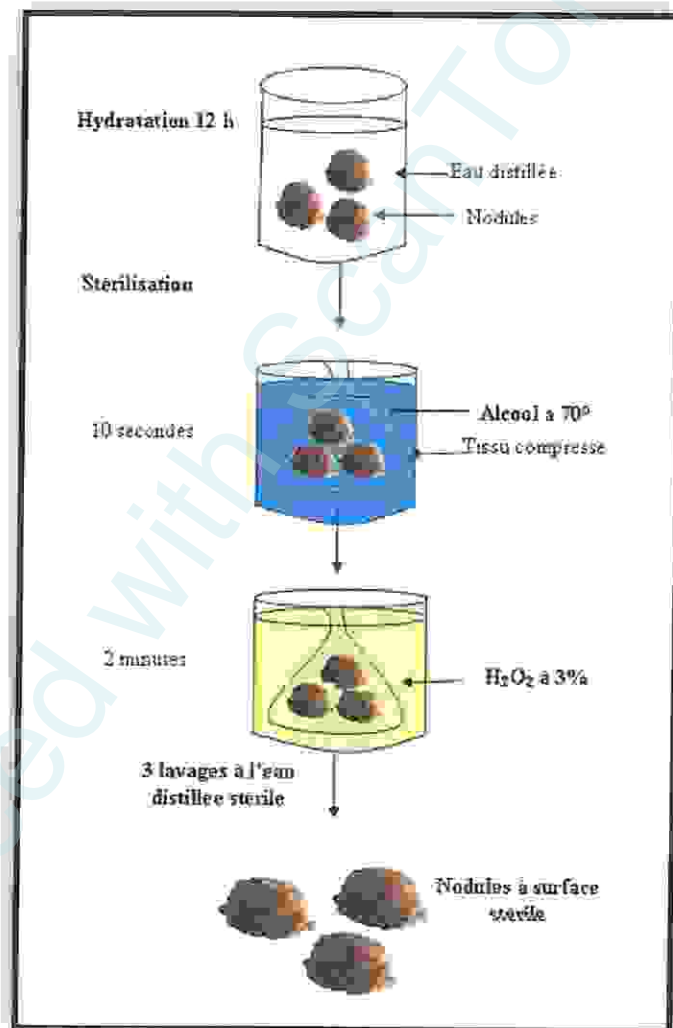
Après détachement des nodules, on a sélectionné ces derniers selon leur nombre de lobes. En triant les nodules à un seul lobe, à deux lobes et ceux à plusieurs lobes (plus de trois lobes). Le tri a été fait pour les nodules des 4 sites de collecte séparément (figure 11).



Figure 11 : Tri des nodules.

❖ **Stérilisation des nodules :**

Après lavage abondant à l'eau distillée, les nodules sont mis dans un tissu compressé stérile. Par la suite, la stérilisation de leurs surface est réalisée par une succession d'immersion dans l'alcool à 70° pendant 10 secondes, puis dans le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à 3% pendant deux minutes, suivi par un rinçage à l'eau distillée stérile au moins trois fois (Date et Halliday, 1987). Le protocole de la stérilisation des nodules est présenté dans la (Figure 12).



**Figure 12 : Stérilisation des nodules.**

❖ **L'écrasement des nodules :**

Après le tri des nodules, chaque groupe a été écrasé selon les étapes suivantes :

- Mettre les nodules (5 à 8) dans un tube à hémolyse stérile à l'aide d'une pince flambée.
- En suite, additionner 1ml d'eau distillée stérile dans chaque tube.
- Enfin, faire l'écrasement à l'aide d'une spatule stérile jusqu'à l'obtention d'un broyat nodulaire.

### II-3 Isolement des souches :

A partir de chaque broyat nodulaire (12 broyats), on a réalisé un étalement sur les boîtes de pétri contenant le milieu YEMA avec rouge Congo à pH 6,8. Après 24 h d'incubation à 28°C, les colonies n'ayant pas absorbées le colorant (colonies blanchâtres ou légèrement rosées) sont isolées (Vincent, 1970) et purifiées par repiquage successif en faisant des dilutions dans 5 ml d'eau physiologique (Figure 13).

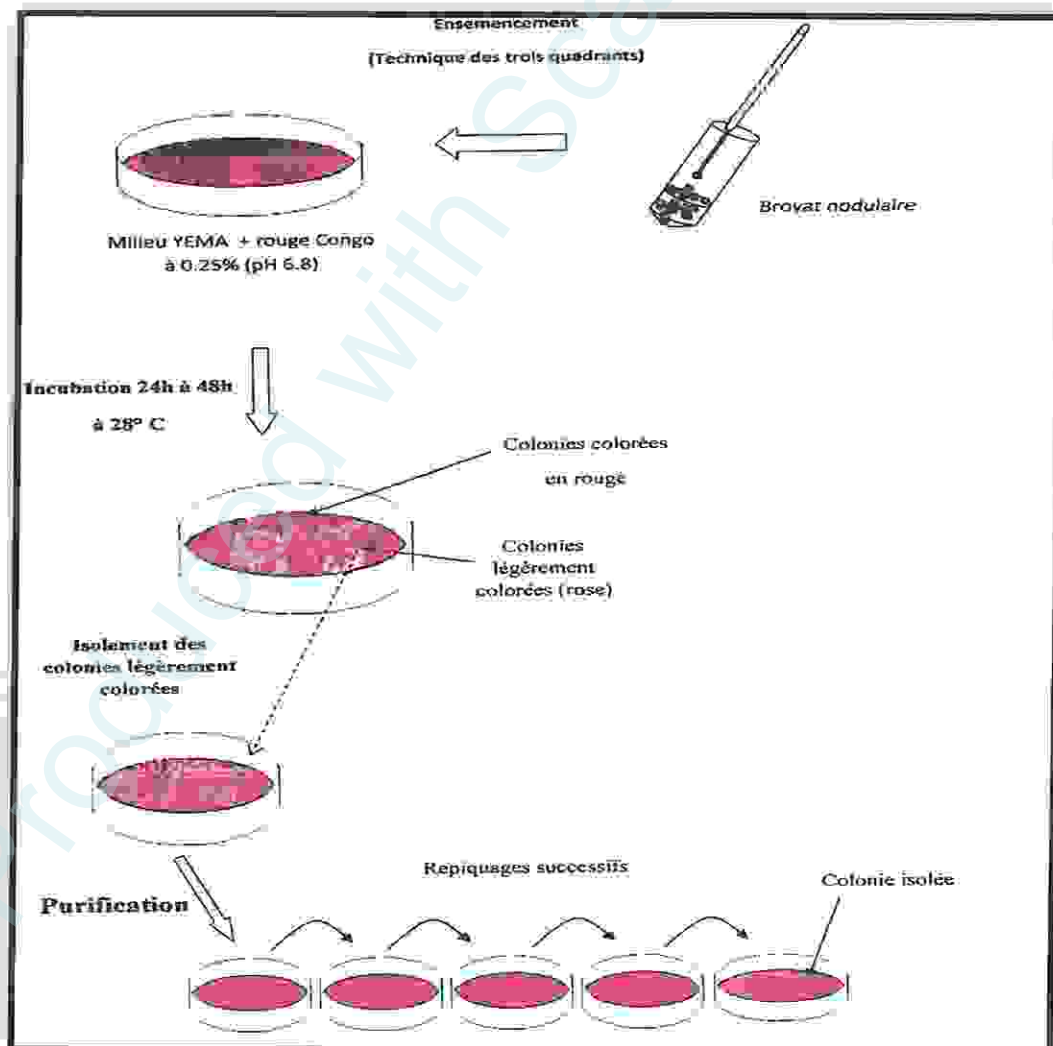


Figure 13 : Technique d'isolement des rhizobies.

**❖ Coloration à la fuchsine :**

Au cours de l'isolement et la purification la forme des souches a été vérifiée par la coloration à la fuchsine. Cette étape, permet de sélectionner les formes typiques des isolats ; a savoir, courts ou très courts bâtonnets.

**Les étapes :**

- Fixer les frottis par passage de la lame propre sur la flamme du bec.
- Couvrir la lame par la fuchsine et laisser agir pendant minute.
- Rincer et sécher la lame puis observer au microscope à l'objectif à immersion (Figure 14).



**Figure 14: Coloration par la fuchsine.**

**II-4 Conservation des souches :**

Après leurs purifications, les souches présumées être des rhizobia ont été incubées dans des tubes inclinés du milieu YEMA à 28°C pendant 48 h. Pour pouvoir réaliser des tests phénotypiques ultérieurement (Vincent, 1970).

**II-5 Etude des caractères phénotypiques des souches :****II-5-1 Caractères culturaux :**

Les souches de rhizobia ont été caractérisées par l'aspect de leurs colonies sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.

### II-5-2 Caractères microscopiques :

Les souches des nodules racinaires du pois chiche ont subi une coloration à la fuchsine pour examiner leurs aspects microscopiques à savoir la forme et la taille des bactéries.

### II-5-3 Critères physiologiques :

#### ➤ Tolérance à la température :

Les différentes souches ont été cultivées sur YEMA à pH 6,8 et incubées aux températures suivantes : 5°C, 15°C, 25°C, 35°C, et 45°C. La lecture a été effectuée après 24 à 48 heures d'incubation.

#### ➤ Tolérance au pH :

Les souches ont été cultivées sur le milieu YMB aux différents pHs : 1, 3, 5,9, et 12. La lecture des résultats a été faite par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm avec agitation pendant 24 heures.

#### ➤ Tolérance à la salinité :

L'étude a été réalisée sur le milieu liquide YEMB à pH 6,8. Les souches ont été incubées à différentes concentrations en NaCl : 2%, 5%, 8%, et 11%. Après incubation, la lecture a été faite par mesure de la densité optique à 600 nm.

#### ➤ Tolérance aux métaux lourds :

Le test a été conduit pour évaluer la capacité des souches à résister à quatre différents types de métaux lourds Pb 250 µg/ml ; Al 250 µg/ml ; Fe 12µ g/ml ; Co 25 µg/ml. Les différents métaux utilisés sont ajoutés séparément au milieu YEMB à pH 6,8 (avant l'autoclavage de milieu). Après incubation la lecture a été réalisée par spectrophotomètre à 600nm.

### ➤ Résistance aux antibiotiques :

Ce critère a été testé sur milieu YEMA en utilisant des disques imprégnés d'antibiotique (méthode de diffusion). Neuf antibiotiques: Erythromycine [E=15 µg/ml], Pipracilline [PIP=100 µg/ml], Oxacilline [OX=1 µg/ml], Tobramycine [TOB =10 µg/ml], Gentamicine [GM =10 µg/ml], Néomycine [NEO =30 µg/ml], Netilmicine [Net = 30 µg/ml], Virginiamycine [VG =15 µg/ml], Rifampicine [RA =5 µg/ml], on été testé. Les boites ont été incubées à 28°C pendant 24 à 48 h.

### II-5-4 Critères biochimiques :

#### ➤ Recherche de la catalase :

Ce test permet de montrer la présence ou l'absence de catalase. Cette enzyme permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) résultant de l'oxydation des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe, selon la réaction suivante :



#### • La méthode

Déposer dans une boîte de pétri propre, une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), puis la mettre en contact avec une goutte de suspension bactérienne.

#### • Lecture

Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de bulles gazeuses (Dellaras, 1998).

#### ➤ Recherche de l'oxydase :

La recherche du *phénylène diamine oxydase* est un des critères les plus employés pour l'identification des bactéries surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette enzyme est



capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine. Ce dernier, est mauve clair et en présence de l'enzyme, il libère un composé mauve foncé.

- **La méthode**

Déposer sur une lame propre les disques d'oxydase (pré-imprégné par le réactif), imbibés avec une goutte d'eau distillée ou eau physiologique stérile.

Prélevé une colonie de la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'étaler sur le disque.

- **Lecture**

Une réaction positive se manifeste par changement de couleur de disque vers le mauve foncé (Dellaras, 1998).

### **II-6 Test de nodulation :**

➤ **Principe :**

La capacité d'induire la formation de nodosités sur la racine de la légumineuse hôte est un critère de base dans la caractérisation des rhizobia. Le test nodulation ou le test d'infectivité est basé sur l'inoculation dans des conditions contrôlés, des grains de pois chiche par les souches isolées.

Après quatre à six semaines d'inoculation, l'infectivité des souches est observée par la formation des nodules racinaires sur les plants inoculés. Ceci signifie que les isolats ont été infectifs vis-à-vis de leur plante hôte *Cicer arietinum* L.

➤ **Protocole expérimental :**

❖ **Germination des graines :**

Les graines de pois chiche ; cultivar FLIP 90-13 sont désinfectées avec 70° ; suivie d'un rinçage avec l'eau distillée stérile. Après, les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri recouvert préalablement d'une couche de coton stérile imbibé d'eau distillée stérile ; en s'assurant que le coton ou les graines de pois chiche soit toujours humide.

L'incubation est effectuée à température ambiante pendant 4 à 5 jours jusqu'à l'apparition des radicelles (Figure 15).

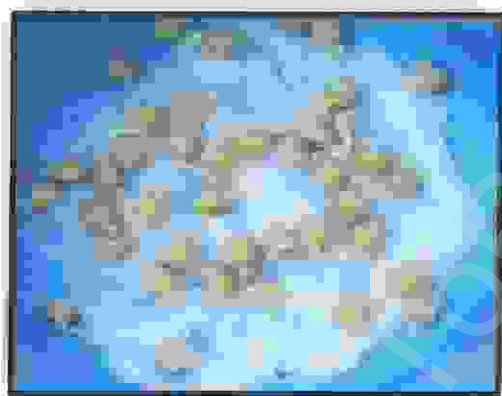


Figure 15 : L'apparition de radicelle.

❖ *Stérilisation du sol :*

Le sol utilisé pour la réalisation de ce test a été pris du terrain de l'ITGC. Sa stérilisation est réalisée au four pasteur pendant 1 h à 200°C.

❖ *Préparation des pots :*

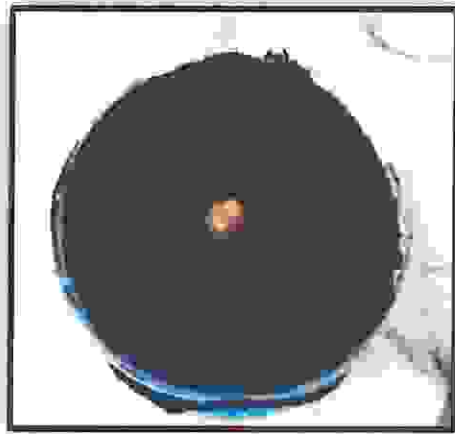
Les pots utilisés sont en plastique désinfectés par l'eau de javel suivi d'un rinçage à l'eau distillée ; ensuite ces pots ont été troués à la base, et recouverts de papier aluminium (Date et Halliday, 1987) (Figure 16).



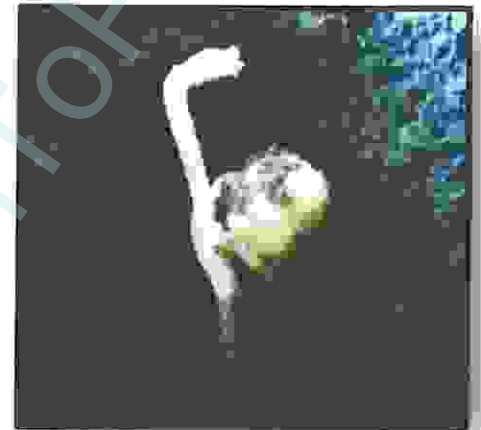
Figure16 : Pots utilisés dans le test de nodulation.

### *Semis des graines germées :*

Le semis des graines a été réalisé 48 h avant l'inoculation en mettant une graine germée par pot. Ces graines ont été déposées dans un trou de 3 cm de profondeur en orientant la radicelle vers le fond du trou (Figure 17).



[a] : Une graine semis par pot.



[b] : Exposition de la radicelle.

**Figure 17 : Semis des graines.**

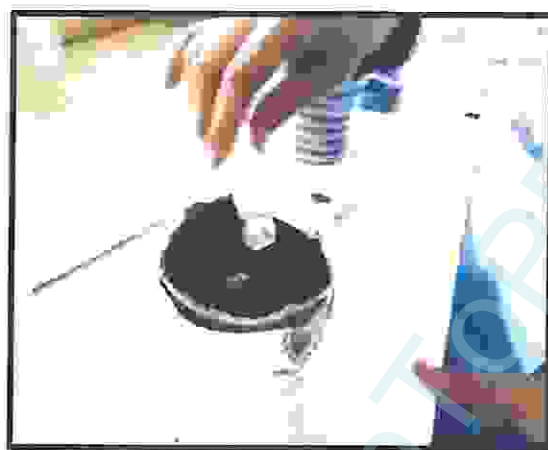
### ❖ *Préparation des inoculums :*

Chaque souche est cultivée sur deux tubes inclinés de milieu YEMA pendant 48 h à 28°C. Après incubation, 1 ml d'eau physiologique à 0,9% est additionné à chaque tube qui sera agité jusqu'à avoir un maximum de culture dans le 1 ml de la solution physiologique.

### ❖ *Inoculation des graines :*

Après 48 h du semis, les 2 ml de chaque inoculum ont été versés sur les radicelles préalablement exposé à l'aide d'une spatule (Figure 18).

Cependant un plant témoin nommé  $T_0$  est non inoculé afin de vérifier que le test s'est déroulé dans des conditions stériles.



**Figure 18 : Inoculation des graines.**

❖ *Eclairage :*

Après inoculation, les pots ont été placés dans un espace bien aéré et exposé au rayon de soleil (figure19).



**Figure 19 : Exposition de la culture à la lumière du jour.**

# Chapitre III

## Résultats et discussion

### 1- Isolement des souches :

Durant notre travail, 22 souches présumées être des rhizobia ont été isolées sur milieu YEMA additionné de rouge Congo.

### 2- Etude des caractères culturaux, microscopiques et biochimiques des souches :

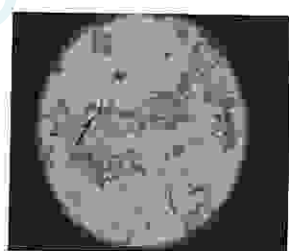
#### ➤ Sur milieu YEMA additionné de rouge Congo :

Après 24 à 48 heures d'incubation à 28°C, l'observation macroscopique des souches sur ce milieu a montré des colonies différentes dans l'aspect cultural. Ce dernier correspond à celui des rhizobia à savoir : colonies mucilagineuses, brillantes, bombées ou plates, à contour régulier ou irrégulier, qui absorbent peu ou pas le rouge de Congo. Ainsi, l'opacité des colonies a varié entre colonies translucides, transparentes ou opaques (Figure 20).

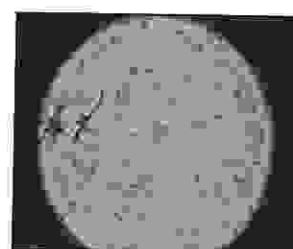


Figure 20 : Aspect cultural d'une souche isolée.

La coloration par la fuchsine a permis d'étudier l'aspect microscopique des souches isolées. L'étude a montré des formes qui varient entre court et très court bâtonnet (Figure 21). Ce résultat correspond à l'un des critères des rhizobia décrit dans le *Bergey's Manual of systematic Bactériology* (1984).



(A) : Courts bâtonnet



(B) : Très courts bâtonnet

Figure 21: Aspects microscopiques des isolats.

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus concernant l'aspect cultural, microscopique et la présence des enzymes catalase et oxydase chez les souches isolées.

**Tableau 4 : caractères culturels, biochimiques, et microscopique des souches.**

souches	Caractères culturels	catalase	oxydase	Aspect microscopique
A1*	Petites colonies brillantes, bombées, contour régulier, claires.	-	-	Forme très court bâtonnet.
A2	Colonies roses, circulaires, bombées, brillantes irréguliers.	-	-	Forme très court bâtonnet.
A3	Colonies mucilagineuse.	+	-	Forme très court bâtonnet.
C1*	Colonies légèrement colorée, plates, brillantes.	+	+	Forme bâtonnet.
C2	Colonies légèrement colorées, bombée.	+	+	Forme bâtonnet.
C3	Colonies légèrement colorées, bombées.	-	-	Forme bâtonnet.
C4	Colonies légèrement colorées, plates, brillantes.	+	-	Forme bâtonnet.
C5	Étalement	+	+	Forme bâtonnet.
S1*	Colonies opaques, plates, brillantes.	+	-	Forme très court bâtonnet.
S2	Colonies opaques, brillantes, bombées.	+	+	Forme très court bâtonnet.
S3	Colonies plates, transparentes, non brillantes, non colorées.	-	-	Forme très court bâtonnet.
S4	Colonies transparentes, légèrement colorées, brillantes, plates.	+	+	Forme bâtonnet
S5	Colonies roses, bombées, brillantes.	+	-	Forme bâtonnet
S6	Colonies transparentes, plates, brillantes.	-	-	Forme très court bâtonnet.
S7	Colonies translucides, plates, légèrement colorées, brillantes.	+	-	Forme bâtonnet
T1*	Colonies transparentes, bombées.	+	-	Forme bâtonnet
T2	Colonies roses, circulaires, brillantes	+	-	Forme bâtonnet
T3	Petites colonies transparentes.	-	-	Forme bâtonnet
T4	Colonies opaques, bombées, brillantes	-	-	Forme bâtonnet
T5	Colonies translucides, claires.	+	+	Forme bâtonnet
T6	Colonies transparentes.	+	+	Forme bâtonnet
T7	Colonies roses.	+	+	Forme bâtonnet

\*A,C,S,T : La première lettre de chaque site de collecte, A : Annaba, C : Constantine, S : Souk Ahras, T : Taref

### 3- Etude des critères physiologiques :

#### ➤ Tolérance au pH :

Les résultats obtenus sur l'étude de la tolérance aux pHs acides et alcalins de l'ensemble des souches sont présentés dans la figure 22. La totalité de souches testées ont pu pousser et tolérées des valeurs de pH de 5 jusqu'à 9. Ce qui l'indique que ces souches sont acido-baso-tolérantes. Nos résultats sont accord avec Graham (1964) et Jordan (1984), où les rhizobia peuvent tolérer à des pHs allant de 4.5 jusqu'à 9.

Cependant, aux pHs très acides la souche C1 a montré une tolérance à un pH3. Notons également que la souche A1 a montré une tolérance au pH1 et pH3.

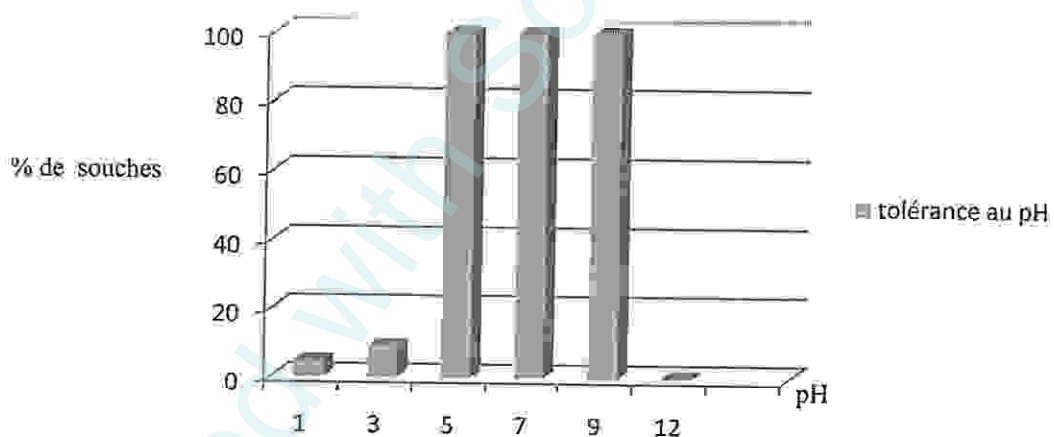
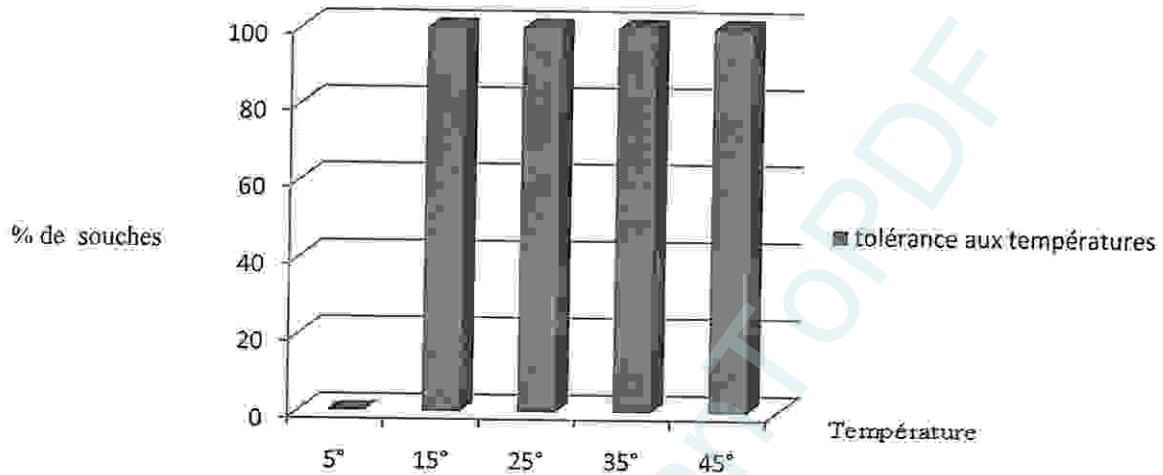


Figure 22 : Effet du pH sur la croissance des isolats de *Cicer arietinum* L.

#### ➤ Tolérance aux températures :

Les résultats indiquant les marges de tolérance à la température des souches isolées de *Cicer arietinum* L. sont représentées dans la figure 23.





**Figure 23 : Effet de température sur la croissance des souches nodulant le *Cicer arietinum* L.**

Comme le montre cette figure, la plupart des souches sont capables de croître à une température de 15°C jusqu'à 45°C. Sauf deux souches S2 et T1 qui ont pu résister à une température de 5°C.

Graham (1992) a rapporté que les rhizobia sont des bactéries mésophiles qui peuvent se développer à des températures se situant entre 10 °C et 37 °C et que la température optimale de croissance de la plus part des souches est 28° C.

➤ **Tolérance à la salinité :**

Les résultats obtenus concernant l'influence de la concentration en NaCl sur la croissance des souches sont présentés dans la figure 24.

D'après cette figure nous remarquons que la totalité des souches testées présentent une bonne croissance à des concentrations allant de 2% à 5%, et une légère croissance à 8% pour la moitié des souches testées (A2, A3, C3, C4, S2, S5, T1, T2, T6 et T7). Cependant, aucune croissance n'est observée à une concentration de 11%.

Ces résultats équivalents sont notés par Jebara et *al.* (2001) et Abbas et *al.* (2001) sur le fait que les Rhizobia à croissance rapide peuvent tolérer des concentrations supérieures à 2%.

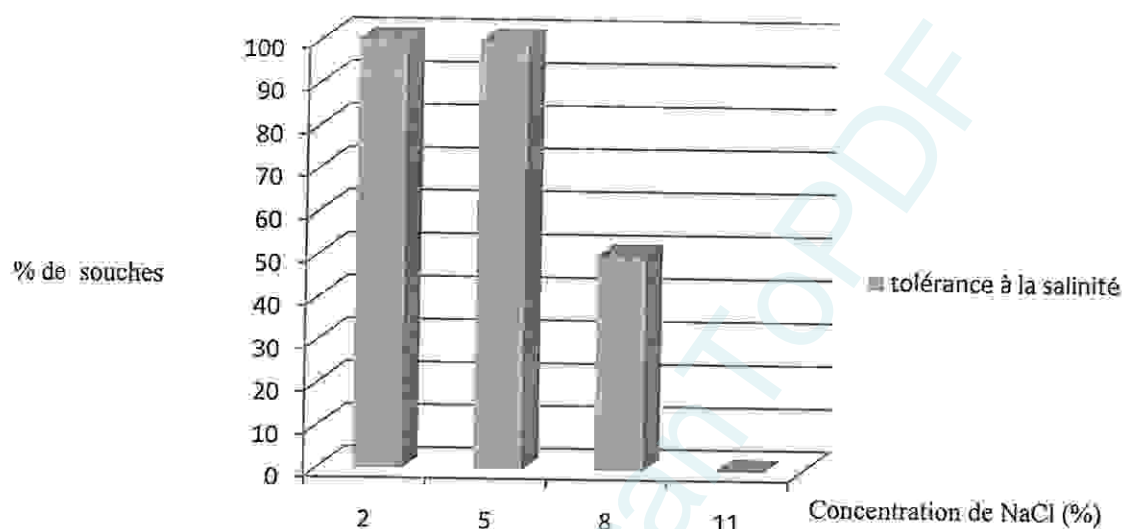


Figure 24 . Effet de salinité (NaCl) sur la croissance des souches nodulant le *Cicer arietinum* L.

➤ Résistance aux antibiotiques :

L'évaluation de résistance aux antibiotiques a été réalisée pour quatre souches (une souche de chaque site). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Résultats des différents antibiotiques testés

/	PiP	OX	N	GM	TOB	E	NET	VG	RA
A3	S*	/	/	S	S	R*	S	/	/
C3	R	R	S	R	S	/	/	R	/
S2	R	R	S	R	S	/	/	/	/
T3	S	R	S	S	R	/	/	R	R

S\* : Sensible

R\* : Résistante

/ : non testé

Les résultats indiquent que les souches montrent des résistances variables via les différents antibiotiques testés.

Graham *et al.* (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre. La figure suivante représente le résultat de la méthode de diffusion pour les souches A3 et T3.

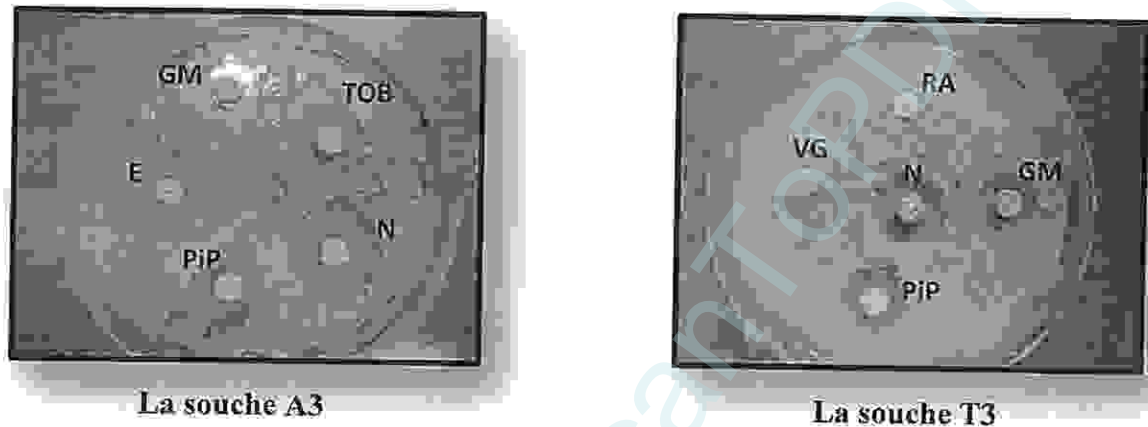


Figure 25 : Etude de la résistance aux antibiotiques par méthode de diffusion.

➤ Tolérance aux métaux lourds :

Les résultats obtenus concernant l'effet des différents métaux lourds testés sur la croissance des souches isolées sont représentés dans la figure suivante.

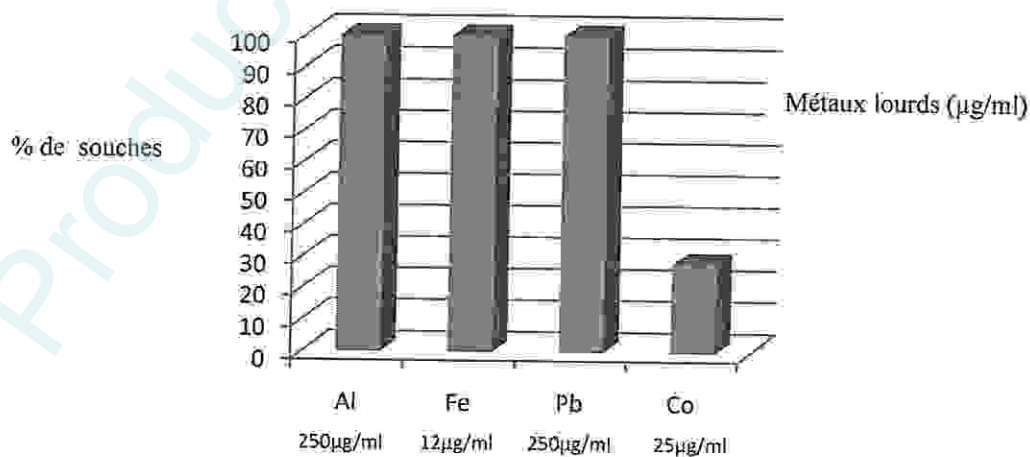


Figure 26: Effet des métaux lourds sur la croissance des isolats.

D'après cette figure nous remarquons que la totalité des souches ont une bonne tolérance à différentes concentrations de métaux lourds testés. A l'exception, du Co qui a été toléré par seulement les 20 % des souches testé (A1, C1, C3 et C4).

L'étude de Maâtallah et *al.* (2002) réalisée sur les isolats de pois chiche dans le sol marocains a montré que le pourcentage les isolats tolérants ces mêmes concentrations de métaux lourds n'a dépassé les 50%.

### 3- Etude de l'infectivité des souches :

Après cinq semaines de culture, l'étude de l'infectivité des 22 isolats vis-à-vis de leur plante hôte *Cicer arietinum* L. a révélé la présence de nodules de nombre variables pour la plupart des isolats. Le tableau 6 récapitulé les résultats obtenus concernant le nombre et la taille des nodules induits.

D'après le tableau, le plant témoin non inoculé n'a révélé aucun nodule. Cela prouve que le test s'est déroulé dans des conditions stériles (Figure 27).



Figure 27: Système racinaire de plant témoin dépourvus de nodules.

Tableau 6 : Nombre aspect et diamètre des nodules induits par les isolats.

	Plante	Nodule / plante	Aspect des nodules
-	*T <sub>0</sub>	0	-
A1	1	4	Des petits nodules blancs de 1mm de diamètre
A2	2	2	
A3	3	0	-
C1	4	3	Des petits nodules blancs de 1mm de diamètre
C2	5	6	
C3	6	5	
C4	7	2	
C5	8	6	
S1	9	2	Des petits nodules blancs de 1mm à 2m de diamètre
S2	10	1	
S3	11	6	
S4	12	1	
S5	13	3	
S6	14	1	
S7	15	15	
T1	16	0	-
T2	17	1	Des petits nodules blancs de 1mm de diamètre
T3	18	1	
T4	19	0	-
T5	20	4	Des petits nodules bilobés
T6	21	4	Des petits nodules blancs de 1mm de diamètre
T7	22	2	

\*T<sub>0</sub>: Non inoculé pour vérifier la stérilité du test.

Ainsi on remarque que la majorité des souches ont induits des nodules blancs de petits diamètre ne dépassant pas les 2 mm (figure 28).

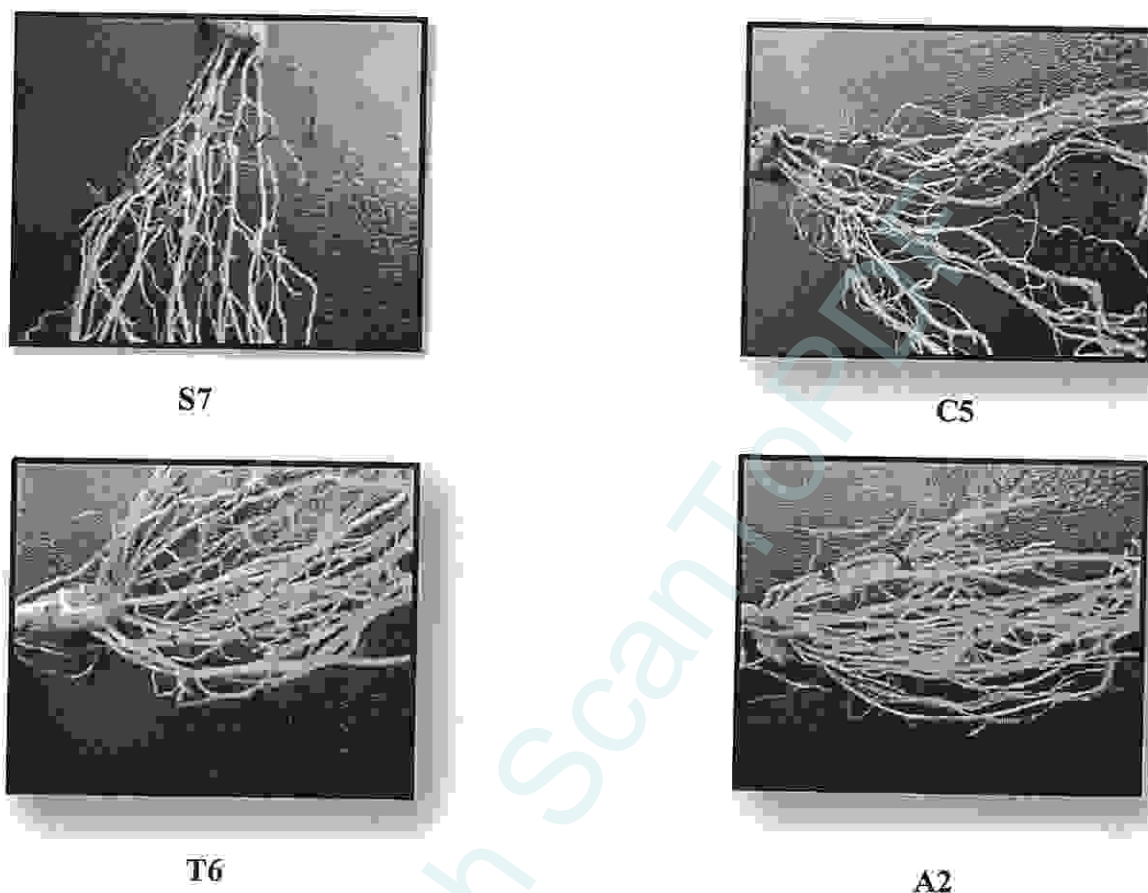


Figure 28 : Aspect des nodules induit par les isolats du pois chiche.

Cependant, seulement 3 souches (A3, T1, T4) qui n'ont induit aucun nodule.

Ce résultat négatif pourrait être expliqué par l'insuffisance de la durée du test de nodulation qui n'a dépassé les cinq semaines. À savoir qu'Aouani *et al.* (2001) ont rapporté que ce test nécessite de sept à huit semaines de culture. Cela n'était pas réalisable dans notre étude car ont été limité par le temps.

La figure 29 compare le nombre de nodules induit par les différentes souches. On remarque que la souche S7 (site Souk Ahras) a été la plus infective en induisant 15 nodules.

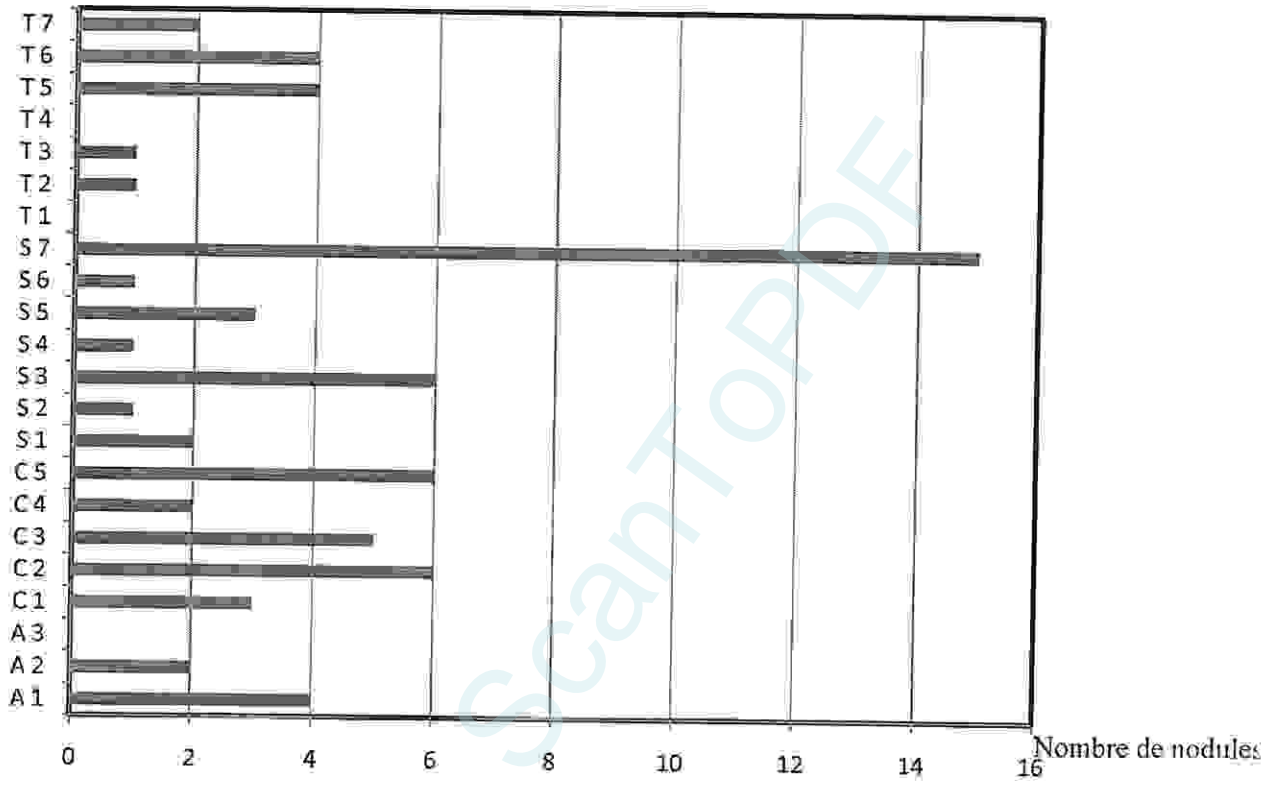


Figure 29 : Comparaison du nombre des nodules induits par les isolats.

---

### ***Conclusion et perspectives :***

Dans cette étude nous avons isolé, purifié et conservé 22 souches rhizobiennes à partir des nodules de pois chiche collectés de quatre régions de l'Est Algérien (Constantine, Annaba, Souk Ahras et Taref). Ces isolats ont été caractérisés sur le plan phénotypique et physiologique.

L'étude culturale et microscopique des souches a montré des courts ou très courts bâtonnets dont l'aspect des colonies est caractéristique des rhizobia (colonies mucilagineuses, translucides, transparentes, bombées, circulaires et plates).

L'étude physiologique a montré que nos souches tolèrent :

- Des valeurs de pH allant de 5 à 9 avec une tolérance remarquable pour une souche au pH 1.
- Des températures à un intervalle compris entre 10 et 45 °C.
- Des concentrations en NaCl allant de 1% jusqu'à 5%.
- les différents métaux lourds testés à l'exception du Co qui a été toléré par quelques souches seulement.

Le test de nodulation réalisé pendant 5 semaines nous a permis de confirmer l'infectivité de 86% souches vis-à-vis de leur plante hôte *cicer arietinum* L.

A l'avenir, nos résultats devraient être complétés par prolongation de la durée du test de nodulation ainsi qu'une étude de l'efficacité des souches nodulantes en mesurant l'activité nitrogénase. De plus, une étude de la résistance aux antibiotiques devrait être réalisée pour la totalité des souches. En fin, une identification sera réalisée par les techniques moléculaires.



## Annexes :

### Composition des milieux :

#### *Milieu YEMA (Vincent, 1970) (g/l) :*

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Agar	20
Eau distillée	1000ml
pH	6.9

#### *Milieu YEMA (Lajudi et al., 1998) (g/l) :*

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Agar	20
Eau distillée	1000ml
pH	6.9

#### *Milieu YMB (Yesat Mannitol Broth) (g/l) :*

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2

NaCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeCl <sub>3</sub>	0.004
Glutamate de sodium	0.5
Mannitol	10
Extrait de levure	1
Eau distillée	1000ml
pH	6.9

**Tableau : le rôle des principaux composants de milieu YEMA.**

<i>Produits</i>	<i>Rôle</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Source de K <sup>+</sup> et PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub>	Source de Mg <sup>+2</sup> et de SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
NaCl	Source de Na <sup>+</sup> et de Cl <sup>-</sup>
Mannitol	Source de carbone
Extrait de levure	Source de protéines et de vitamines

#### **Préparation des milieux :**

- *Milieu YEMA additionné de rouge Congo (Vincent, 1970)*

On rajoute 10ml de la solution rouge Congo à 0.25‰ pour 1000 ml de milieu avant le stérilisé.

- **Solution nutritive extrait du sol (g/l) :**

Faire bouillire les 100g du sol additionné de 1 litre d'eau distillée pendant 10 minutes puis laisser les décompter.

## Références Bibliographiques :

-A-

Abbas M., Monib M., Rammah A., Fayez M., Hegazi N. 2001. Intercropping of (*Sesbania sesban*) and leuceana (*Leucaena leucocephala*) with five annual grasses under semi-arid conditions as affected by inoculation with specific rhizobia and associative diazotrophs. *Agronomie* 21 : 517-525.

Allen O. N., Allen E.K., 1950. Biochemical and Symbiotic Properties of the Rhizobia. *Bacterial.Rev.*14: 273-330.

Aveline A., Bodet J.M., Brad M., Carroue B., Calamy H., Cananec G., Creusot A., Delouvee R., Dumuent S., Jannot Ph., Justes E., Kouassi A., Laurent F., Lecoq C., Gall A., Delliou L., Machet J., Mathys L., Combe D.M., Morvan T., Mouchart A., Nalin V., Ney B., Segaud L., Simon J.C., Guillaume T., Villard A et Wery J, (1999). Fertilisation azotée de trois légumineuses le haricot, la Luzerne et le pois proteagineux, 48p.

Aouani M. E., Mhamdi R., Jebara M. & Amarger N. (2001). Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie*. 21:577-581.

Ayisi, K. K. D. H. Putnam, C. P. Vance, and P. H. Graham, 1992. *Bradyrhizobium* inoculation and nitrogen fertiliser effects on seed yield and protein of white lupin. *Agronomy J.* 84, 857-861.

-B-

Bacha F. (1998). Etude de l'effet du stress hydrique sur la nutrition azotée du pois chiche (*Cicer aritimum L.*). In *Actes : séminaire national sur les légumineuses alimentaires*,

pp. 100-117. Eds. Labdi M., Maatougui M. E. H., Bouznad Z., Benabdelli K. & Benssedik B.

**Begum A., Gafur M.A, 2001.** Studies on the root distribution and their effect on growth performance of fast growing tree species. *Bengladesh journal of botany* 18(1):51-56.

**Benguedouar A., 2000.** Étude de la symbiose : *Rhizobium -Hedysarum coronarium*. Essai de la caractérisation de l'espèce *Rhizobium hedysary*. thèse de doctorat de l'université de Constantine. Algérie .

**Benson DR, Silvester WB, (1993).** Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* 57: 293-319 p .

**Biondi EG, Pilli E, Giuntini E, Roumiantseva ML, Andronov EE, Onichtchouk OP, Kurchak ON, Simarov BV, Dzyubenko NI, Mengoni A, Bazzicalupo M, (2003).** Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiology Letters* 220: 207-213

**Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J, (2003).** Beans (*Phaseolus* spp.) . Model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55–128.

-C-

**Chen W. X., Yan G.H et Li J. L, (1988).** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned by *sinorhizobium*. 392-397p.

-D-

**Date R. A. et Halliday J.(1987).** Collection and maintenance of rhizobia. In symbiotique nitrogene fixation technology, EL KAM G.H.(ed.), 14-24 p.

**Delarras C. (1998).** Microbiologie, 90 heures de travaux pratiques, pp. 65-125.  
Ed. Gaétan Morin Europe.

**Denarie J., 2000.** Les symbioses racinaires, dans le monde végétal, du génome à la plante entière. Académie des sciences, rst n° 10. Editions TEC et DOC.

**Djebali N, 2008.** Etude des mécanismes de résistance de la plante modèle *Médicago truncatula* vis-à-vis de deux agents pathogènes majeurs des légumineuses cultivées : *Phomo medicaginis* et *Aphanomyces euteiches*. Université de Toulouse, 209 p.

**Downie JA, (2005).** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* 15: 6 p.

-E-

**Ernst W.H.O, (1990).** Mine vegetation in Europe. In A. Shaw(ed), Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Fla. p 21.

-F-

**Fred E., Baldwin I. L et Mc Coy E, (1932).** Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Press. 343 p.

-G-

**Gage D.J, 2004.** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68 (2): 280-300 p.

**Giraud E. (2007).** Symbiose rhizobium/légumineuse : un nouveau sesame. Vol.23, N° 6-7, 4p

**Gordon M, (2002).** Pois chiche: situation et perspectives. Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol 15, n° 16.

**Gordon M, (2006).** Pois chiche : situation et perspectives. Bulletin bimensuel Agriculture et Agroalimentaire Canada. Vol 19, n° 13.

**Graham, P. H. 1964.** Studies on the utilization of carbo-hydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie van Leeuwenhoek.* 30, 68-72.

Graham, P. H., M. J. Sadowsky, H. H. Kersters, Y. M. Barnet, R. S. Bradley, J. E. Cooper, D. J. De Ley, B. D. W. Jarvis, E. B. Roslycky, B. W. Strijdom, and J. P. W. Young, 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 582-587.

Graham, P. H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38, 475-484.

-H-

Haukka K., Lindstrom K., Young P.W, 1998. Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol.Rev.* 64 (2) : 419-426.

Hamadache A et Ait Abdallah F, 1998. Lutte contre les adventices en culture du pois chiche d'hiver : un facteur déterminant pour la valorisation du matériel végétal et du semis précoce .céréaliculture N°33 ISSN 1011-9582.

Hélène Roudaut, (2005). Alimentation théorique, 149-151 p.

Hopkins W.G, 1999. Introduction to plant physiology, second edition. John Wiley andsons, Inc.

Howieson, J. G., I. R. P. Fillery, A. B. Legocki, M. M. Sikorski, T. Strepkowsky, F. R. Minchin, and M. J. Dilworth, 1998. Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. Pp. 149-180. *In* Lupins as Crop Plant. Biology, Production and Utilization (J. S. Gladstones, C. A. Alkins and J. Hamblin, eds.). CAB International, Oxon, UK.

-J-

Jebara M., Drevon J.J., Aouani M.E. 2001. Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native Rhizobia from Tunisian soils , *Agronomie* 21: 601-605.

**Jordan D. C., 1984.** Rhizobiaceae. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore. P: 234-245.

**Journet E.P, 2004.** Symbioses racinaires. Fiche 4. L'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais.

**Jeder (H.), De lajudie (P.), Dreyfe (SB.), Le Floch(E.), BEhaegh (TE.), Zafoor (MI. S.), Akrimi (N.), 1996 -** Etude de la nodulation des légumineuses autochtones des régions arides de Tunisie. *Revue des Régions Arides*, 9 ; 3-10.

**-K-**

**Kurlovich, B. S., I. A. Tikhonovich, I. T. Kartuzova, and A. P. Kozhemyukov, 1997.** Trends and methods of lupine breeding for increasing level of symbiotic nitrogen fixation. *Bull. Appl. Bot. Gen. Plant Breed.* 152, 39-47.

**-L-**

**Lajudie (de) P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M. P., Dreyfus B. & Gillis M. (1998).** Characterization of tropical tree rhizobium and description of *Mesorhizobium pulrifarium* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 48: 369-382.

**Link J, Graeff S, Batchelor WD, Claupein W, (2006).** Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91: 135-153 p.

**Liu P.H., Gan Y., Warkentin T., McDonald C. 2003.** Morphological plasticity of chickpea in a semiarid environment. *Crop Sci.* 43:426-429.

-M-

**Maâtallah J., Berraho E.B., Sanjuan J. & Luch C. (2002a).** Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*. **22**: 321-329.

**Maatougui M. H. (1998).** Le développement du secteur stratégique des légumineuses alimentaires. *Rev. Céréaliculture*, n° 25, pp. 12-14, Ed. ITGC S. B. Abbas.

**Melakhessou Z, (2007).** Etude de la nuisibilité directe des adventices sur la culture de pois-chiche) d'hiver (*cicer areitinum* L) variété ILC3279, cas de *Sinapis arvensis* L. agrotechnie. Université El-Hadj Lakhdar-Batna, 72 p.

**Moreira (F . M. S.), Silva ( M. F.), Faria (S . M.), 1992 .** Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol.* **121** : 563-570.

-P-

**Perry J.J., staley J.T., Lory S., 2004.** Microbiologie. Edition Dunod, Paris.

-R-

**Richter Gerhard, 1993.** Métabolisme des végétaux , physiologie et biochimie. Ed. press polytechniques et universitaires Romandes. 526 p.

-S-

**Sahgal M, Johri BN, (2003).** The changing face of rhizobial systematics. *Current Science* **84**: 43-48.

**Sahgal M, Johri BN (2006)** Taxonomy of rhizobia: Current status. *Current Science* **90**: 486.

**Sanchez F., Padilla J.E., Hector P. and Lara M, 1991.** Control of nodulin genes in root nodule development and metabolism. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 507-528.